

بررسی اثر Avastin بر آپوپتوز سلول های همکشتی داده شده HepG2 بر هیدروژل حاوی سلول HUVEC از طریق عملکرد مسیر مولکولی P53 و تغییرات سطح گونه های اکسیژنی اکسایشگر

الهام نقی موسوی قزلجه^۱، هانیه جعفری^{۲*}، زهرا کیان مهر^۳

چکیده

مقدمه

کارسینوم هپاتوسلولار پنجمین سرطان شایع در سراسر جهان می باشد که با عوارض شدید همراه است. در این پژوهش، بررسی اثر داروی آواستین بر تکثیر سلولهای HepG2 از طریق فعال شدن مسیر P53 و تغییر محتوای آنتی اکسیدانی سلولهای HepG2 کشت داده شده بر داربست هیدروژلی حاوی سلولهای HUVEC انجام شد. سلولهای HepG2 بر روی داربست هیدروژلی کلاژن نوع I حاوی HUVEC کشت داده شدند و پس از تیمار با غلظت های مختلف آواستین، زنده ماندن سلول ها، با استفاده از تست MTT و میزان آپوپتوز با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری انجام شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدی، فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، وضعیت اکسیدانی کل (TOS) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (TAS) با استفاده از روش کالرومتریک و میزان پروتئین p53 با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی انجام شد. بررسی نتایج نشان می دهد که میزان آپوپتوز در سلولهای HepG2 همکشتی شده با Scaffold-HUVEC و داروی آواستین نسبت به سایر گروه ها بیشتر است. نتایج، نشان دهنده افزایش معنی دار میزان اکسیدان کل و مالون دی آلدئید و کاهش معنی دار میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت آنتی اکسیدان کل در دو گروه HepG2+Scaffold-HUVEC و HepG2+Scaffold باعث افزایش درصد میزان p53 در سلول های HepG2 تحت تیمار همکشتی شده با Scaffold و Scaffold-HUVEC شود. داربست هیدروژلی به عنوان یک گزینه برای شبیه سازی بهینه زندگی سلولهای سرطانی استفاده و نشان داده شد که آواستین توانایی تأثیر ضد سرطانی شایانی در این ساختارها دارد.

واژگان کلیدی: آنتی اکسیدان، داربست هیدروژلی، سرطان، کبد، آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۸

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
h-jafary@srbiau.ac.ir

۳- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

اندوتلیال عروقی (VEGF) در فعال سازی سلول های اندوتلیال نقش دارد و عامل اصلی رگزایی تومور است (۷). مهار رشد و بقای سلول های اندوتلیال از طریق استفاده از مهارکننده های اینترگرین اختصاصی اندوتلیال، یا مهار تهاجم سلول های اندوتلیال با استفاده از مهارکننده های خاص MMP ها، رویکردهایی برای جلوگیری از رشد و گسترش تومور هستند (۸).

سرنوشت یک سلول سرطانی به توانایی آن برای زنده ماندن و تکثیر در ریزمحیط محلی آن بستگی دارد. اگر شرایط محیطی نامناسب باشد سلول سرطانی نمی تواند به تکثیر و بقای خود ادامه دهد. کتام ها یا نیچه ها را می توان به صورت ریزمحیط های تخصصی تعریف کرد که سرنوشت سلول ها را به صورت ارتباطات سلولی و عوامل ترشحی تنظیم می کنند (۹). ریزمحیط تومور شامل سلول های تومور، سلول های استرومایی تومور مانند فیروبلست های استرومایی، سلول های اندوتلیال و سلول های ایمنی مانند میکروگلیا، ماکروفاژها و لنفوسیت ها و اجزای غیر سلولی ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن، فیبرونکتین، هیالورونان، لامینین و غیره است. سلول های تومور به عنوان قلب ریزمحیط تومور، عملکرد اجزای سلولی و غیر سلولی را از طریق شبکه های سیگنالینگ پیچیده کنترل می کنند تا از سلول های غیر بدخیم به نفع خود استفاده کنند. پیامد چنین تلاقی هایی در تشکیل و نگهداری تومور و همچنین پاسخ ناقص به درمان و مقاومت چند دارویی (MDR) منعکس می شود. سلول های غیر بدخیم موجود در ریزمحیط تومور نیز موجب ترویج تومورزایی در تمام مراحل توسعه سرطان و متاستاز می شوند (۱۰).

کنام سلول منبعی از گونه های فعال اکسیژن (ROS) محسوب می شود که بر فنوتیپ سلولی و هموستاز بافت تأثیر زیادی می گذارد. ROS ها می توانند به طور مستقیم بر

مکانیسم های اپی ژنتیک و DNA اثر بگذارند. ROS بخشی جدایی ناپذیر از متابولیسم، در سلول است که با فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ لازم برای رشد و تکثیر سلولی، نقش مهمی در فرآیندهای سلولی در غلظت های فیزیولوژیکی ایفا می کنند. تولید بیش از حد ROS به ماکرومولکول های زیستی سلول مانند DNA، پروتئین ها و لیپیدها آسیب می زند. اولین خط دفاعی در برابر ROS، آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند SOD می تواند تبدیل آنیون سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) را به O_2 و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) کاتالیز می کند. سه ایزوform SOD در پستانداران وجود دارد: SOD سیتوپلاسمی که نیاز به روی یا مس دارد (SOD1)، SOD میتوکندریایی که نیاز به منگنز دارد (SOD2) و SOD خارج سلولی (ECSOD، SOD3). H_2O_2 تولید شده در نتیجه تغییر شکل $O_2^{\bullet-}$ توسط SOD همچنین توسط کاتالاز یا گلوکاتایون پراکسیداز به H_2O احیا می یابد. مشخص شده است که التهاب، سیگنال های انکوژنیک، جهش های DNA و اختلال عملکرد در زنجیره تنفسی نقش مهمی در القای استرس اکسیداتیو دارند (۱۱-۱۳).

در حال حاضر، درمان سرطان کبد بسیار پیچیده می باشد و گزینه های درمانی بر اساس پیشرفت تومور و بیماری زمینه ای انتخاب می شود. در حال حاضر روش های درمانی برای سرطان کبد همچون شیمی درمانی و یا جراحی با عوارض جدی و در برخی موارد با عود بیماری همراه هستند (۱۴، ۱۵). از میان داروهای هدفمند درمان سرطان، استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال می تواند نویدبخش روش درمانی جدیدی برای درمان باشد (۱۶). آواستین (بواسیزوماب) با فرمول شیمیایی

$C_{6638}H_{10160}N_{1720}O_{2108}S_{44}$ یک آنتی بادی مونوکلونال است که فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) را هدف قرار می دهد (۱۷). مطالعات مختلف نشان داده اند که آواستین می

تواند مورفولوژی سلول های سرطانی را تغییر دهد و میزان آپوپتوز سلولی را افزایش دهد (۱۸، ۱۹).

پژوهش ها نشان داده است که کنام سلولهای سرطانی می تواند بر کیفیت داروهای ضدسرطانی اثر داشته باشد. هیدروژل از دسته پلیمرهای زیست سازگاری می باشد که می توان از آن برای شبیه سازی کنام سلولها استفاده نمود. هیدروژل یک شبکه سه بعدی متشکل از پلیمرهای آبدوست می باشد که می تواند مقادیر زیادی آب را جذب نماید (۲۰). هیدروژل های زیست سازگار با ساختارهای چند شبکه ای و متخلخل از زمانی که توسط محققان کشف شدند به طور گسترده در طیف وسیعی از کاربردهای زیست پزشکی مانند بازسازی بافت استخوانی، ترمیم زخم، درمان ضد میکروبی، بیوسینینگ و درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته اند (۲۱-۲۳). هیدروژل ها زیست سازگاری عالی، زیست تخریب پذیری، بارگیری دارو و آزادسازی کنترل شده داروها را ارائه می دهند و به طور گسترده در رادیوتراپی سرطان، شیمی درمانی، ایمونوتراپی، هایپرترمی، فتودینامیک تراپی و فتوتراپی استفاده می شوند (۲۴). شاید هیدروژل ها کلید رساندن مؤثر داروهای فعال به اهداف مورد نظر، کاهش عوارض جانبی ناشی از این داروها و به حداکثر رساندن اثربخشی آنها باشند. به دلیل رهایش کنترل شده و پایدار مؤثر داروهای ضد سرطان، هیدروژل می تواند ۸۰ درصد سلول های سرطانی را پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون از بین ببرد و اثر مهاری با کارایی بالایی بر سرطان نشان می دهد (۲۴، ۲۵). مطالعات نشان داده اند که خواص منحصربه فرد هیدروژل ها سبب گسترش و فعال سازی سلول های CAR-T شده و کارایی داروها را عمیقاً در درمان تومورهای جامد در موش بهبود می بخشد (۲۶).

با توجه به اینکه محیط رشد سلولهای سرطانی نقش بسیار مهم و موثری در تکثیر، گریز از آپوپتوز و رگزایی دارد پس

شناخت کنام این سلولها می تواند پژوهشگران را به درمان نزدیکتر نماید. لذا در این مطالعه به بررسی تاثیر داروی آواستین بر زنده مانی، میزان p53 و وضعیت سیستم اکسیدانی سلولهای HepG2 هم کشتی داده شده بر داربست هیدروژلی حاوی سلول HUVEC پرداخته شد.

مواد و روش کار

کشت سلولی

سلول های HUVEC و HepG2 از مرکز ذخایر ژنتیک ایران خریداری شد. سلول ها در محیط RPMI 1640 (Sigma) حاوی 10% FBS (GIBCO- America) کشت داده و جهت تکثیر در انکوباتور سلولی قرار داده شدند تا به تراکم مناسب برسند. تعویض محیط سلول ها هر سه روز یکبار انجام شد. ۵۰۰۰ سلول HUVEC به هیدروژل ترکیب شده از کلاژن تیپ I و فیبروئین (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر کلاژن تیپ I و نسبت حجمی ۷٪ از فیبروئین که به کلاژن اضافه شده است) اضافه شد (۲۷). به سلولهای HUVEC، ۲۴ ساعت فرصت داده شد تا در داخل هیدروژل قرار بگیرند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، سلولها با غلظت های مختلف آواستین تیمار شدند.

بررسی سمیت سلولی داروی آواستین

زنده مانی سلولی توسط تست MTT (-[4,5]-3) dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) بررسی شد. در این مطالعه ۴ گروه لحاظ شد: HepG2، HepG2 همکشتی داده شده با Scaffold-HUVEC، در گروه های ۳ و ۴ به ترتیب سلول های HepG2 همکشتی داده شده با Scaffold و همکشتی داده شده با Scaffold-HUVEC با ۳ غلظت آواستین (۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر) تیمار شدند. ۱۰ هزار سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه بر روی داربست کشت داده شده و تحت تیمار با غلظت های مختلف

انجام شد. برای ترسیم نمودار از نرم افزار flow jo و آنالیز آماری از نرم افزار prism5 استفاده شد.

بررسی پراکسیداسیون لیپیدی

در این مطالعه برای اندازه گیری MDA (مالون آلدئید) از کیت Zellbio استفاده شد. سلول ها در یک میلی لیتر از بافر ریپا ریخته و بصورت هوموژن درآوردند. به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت جدا و برای آزمایشات بعدی ذخیره گردید. پس از آماده سازی محلول های مورد نیاز و رساندن به دمای محیط، مطابق دستورالعمل کیت، محلول ها به نمونه اضافه شد و سپس ۱ ml از محلول کروموزنیک به هر میکروتیوب اضافه و میکروتیوب ها به مدت یک ساعت درون آب جوش قرار داده شدند. میکروتیوب ها درون ظرف یخ خنک شدند و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. μL ۲۰۰ از محلول رویی به درون چاهک میکروپلیت ریخته شده و جذب آن در طول موج ۵۳۵ نانومتر با دستگاه الیزا خوانده شد. آنالیز نتایج، براساس منحنی استاندارد بدست آمده، محاسبه شد.

بررسی فعالیت SOD

فعالیت SOD با استفاده از کیت سنجش آنزیمی کالریمتری (ZellBio GmbH, Ulm, آلمان) و دستورالعمل آن اندازه گیری شد. ابتدا، نمونه ها برای تست SOD تا زمان انجام کار در دمای انجماد 20°C - ذخیره شد. سلول ها در یک میلی لیتر PBS ریخته شد و در جای خنک هوموژن و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت جدا شد تا برای آزمایشات بعدی ذخیره گردد. در این سنجش، واحد فعالیت SOD به عنوان مقدار نمونه در نظر گرفته شد که تجزیه ۱ میلی مول O_2 به H_2O_2 و O_2 را در ۱ دقیقه کاتالیز می کند. فعالیت SOD به روش رنگ سنجی در ۴۲۰ نانومتر تعیین شد.

آواستین قرار گرفتند، سپس به منظور چسبیدن سلول ها، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند و در نهایت محیط رویی خارج شد. بعد از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت از کشت سلول ها بر روی داربست، سلول ها برای تست MTT آماده شد. برای انجام این تست، ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT با رقت ۱/۱۰ از استوک اولیه به هر خانه اضافه گردید. پلیت ها به مدت ۳ تا ۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. پس از گذشت این مدت زمان، محلول رویی سلول ها خارج گردید. در ادامه به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و به مدت به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و در نهایت میزان جذب در طول موج ۵۷۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد.

بررسی آپوپتوز سلولی با روش فلووسایتومتری

جهت بررسی آپوپتوز در سلول های تحت تیمار شده، از کیت انکسین خریداری شده از شرکت سیگما استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ هزار سلول از گروه های مختلف سلولی: HepG2، HepG2+Scaffold-HUVEC، HepG2+Scaffold-Avastin و HUVEC+ Avastin داخل میکروتیوب ریخته با ترکیب Binding Buffer 1x موجود در کیت به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. یک نمونه به عنوان کنترل بدون رنگ جهت تنظیم دستگاه استفاده شد. میکروتیوب حاوی نمونه با ۵ میکرولیتر از Annexin V FITC ترکیب و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C درجه و در تاریکی انکوبه شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، لوله ها با ۱ میلی لیتر از بافر Binding Buffer 1x با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر از Binding Buffer 1x به نمونه ها اضافه شد. در زمان خوانش به نمونه ها ۳ میکرولیتر PI اضافه و خوانش با استفاده از دستگاه فلووسایتومتری-calibur BD

بررسی TOS

اندازه گیری TOS با استفاده کیت سنجش آنزیمی کالریمتری (ZellBio GmbH، Ulm، آلمان) انجام شد. سلول ها در یک میلی لیتر از بافر ریپا ریخته و در جای خنک هوموژن و در ۲۰ دقیقه با ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت جدا و برای آزمایشات بعدی ذخیره شد. برای آماده سازی کیت به ازای هر نمونه ۲۰۰ μL از Buffer TOS با ۲ μL از محلول Developer ترکیب شد. به هرچاهک ۵۰ μL میکرولیتر از نمونه اضافه شد. از Buffer PBS به عنوان بلنک استفاده شد و ۳۰ μL از این محلول به چاهک اضافه شد. از محلول کاری ۲۰۰ μL به هرچاهک اضافه شد. در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس جذب در ۵۶۰ نانومتر خوانده و یادداشت شد مقدار میانگین جذب بلنک از نمونه ها و استاندارد کم شد.

بررسی TAC

اندازه گیری TAC با استفاده کیت سنجش آنزیمی کالریمتری (ZellBio GmbH، Ulm، آلمان) انجام شد. سلول ها در یک میلی لیتر از بافر ریپا ریخته شد و سپس در جای خنک هوموژن و به مدت ۲۰ دقیقه با ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت جدا و برای آزمایشات بعدی ذخیره شد. به هرچاهک ۳۰ μL از نمونه و استاندارد اضافه شد. از Buffer PBS به عنوان بلنک استفاده شد و ۳۰ μL از این محلول به چاهک اضافه شد. ۵۰ μL از محلول کاری TAC به هرچاهک اضافه شد. در نهایت جذب پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش شد.

بررسی میزان پروتئین p53 با روش ایمونوسیتوشیمی

جهت بررسی میزان پروتئین P53 در گروه های مختلف سلولی تحت تیمار با آواستین، از تکنیک ایمونوسیتوشیمی (ICC) استفاده شد. ابتدا سلول های داخل پلیت با پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه فیکس شده و سپس نمونه ها با PBS در ۳ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شستشو

داده شدند. تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نفوذپذیر کردن غشاء سلول ها به نمونه ها اضافه و نمونه ها با PBS شستشو داده شدند. سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۴۵ دقیقه به منظور متوقف کردن واکنش آنتی بادی ثانویه به نمونه ها اضافه شد. پس از برداشتن سرم بز، آنتی بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰) با PBS بر روی نمونه ها ریخته و نمونه به مدت ۲۴ ساعت درون یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت پلیت از یخچال خارج و ۴ بار با PBS شستشو داده شده، سپس آنتی بادی ثانویه با رقت ۱ به ۵۰ به نمونه ها اضافه شدند و در انکوباتور ۳۷°C (مدل AriaTeb) به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. نمونه از انکوباتور به اتاق تاریک منتقل و بعد از ۳ بار شستشو، به آن ها رنگ (DAPI (D9542 Sigma اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه نمونه با PBS شستشو داده شد و در نهایت عکس برداری فلورسنت با میکروسکوپ Olympus انجام شد.

آنالیز آماری

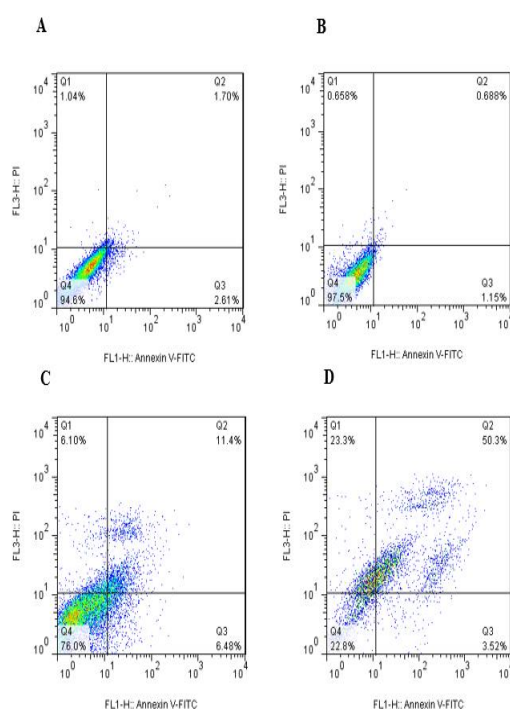
تمامی داده ها از نظر آماری با استفاده از نرم افزار اکسل، Graph Pad Prism و آنالیز واریانس یکطرفه (one-way-ANOVA) و آزمون Tukey بررسی شد. نتایج بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد. اختلاف میان گروه ها در سطح $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار prism نسخه ۵ رسم شد.

نتایج

زنده مانی سلول های تیمار شده با دارو

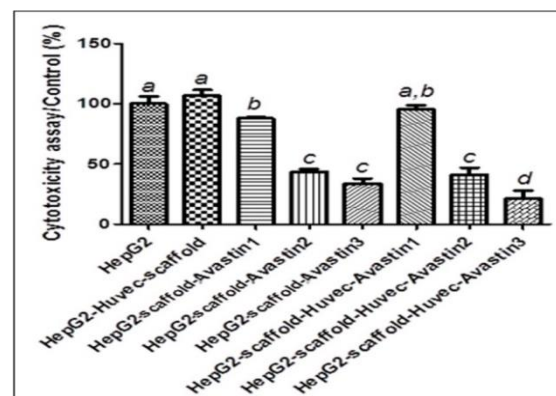
نمودار ۱ نشان دهنده کاهش معنی داری در زنده مانی گروه سلولی HepG2+Scaffold در تیمار با غلظت های ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ آواستین نسبت به گروه های HepG2 و HepG2+Scaffold-HUVEC می باشد ($P < 0.05$). در حالیکه تفاوت معنی دار ($p < 0.05$) بین گروه HepG2+Scaffold تیمار شده با ۱۰۰ ng/ml نسبت به

های HepG2+Scaffold-HUVEC و HepG2 نسبت به یکدیگر تفاوت معنی داری را نشان نمی دهند (نمودار ۲)، این در حالی است که پس از تیمار با آواستین، درصد سلولهای آپوپتوز شده در دو گروه HepG2+Scaffold-HUVEC و HepG2+Scaffold نسبت به یکدیگر و نسبت به گروه های تیمار نشده با آواستین تفاوت معنی داری نشان می دهند ($P<0.05$).



نگاره ۱- درصد سلولهای آپوپتوز شده با استفاده از روش فلوسایتمتری. (A) گروه سلول های تیمار نشده HepG2، (B) گروه سلول های تیمار نشده HepG2+Scaffold-HUVEC، (C) گروه سلول های تیمار شده HepG2+Scaffold+Avastin، (D) گروه سلول های تیمار شده HepG2+Scaffold-HUVEC+Avastin. Q1) نشان دهنده سلول های نکروتیک، Q2) نشان دهنده سلول های آپپتوتیک تاخیری، Q3) نشان دهنده سلول های آپپتوتیک اولیه و Q4) نشان دهنده سلول های زنده می باشد).

گروه های HepG2+Scaffold تیمار شده با ۵۰۰ ng/ml و ۲۵۰ آواستین مشاهده شد. بین دو گروه تیمار شده با غلظت های ۵۰۰ ng/ml و ۲۵۰ آواستین سلولهای کشت داده شده روی داربست هیدروژلی تفاوت معنی داری ($P<0.05$) بین زنده مانده سلولها مشاهده نشد. مقایسه دو گروه سلولی HepG2+Scaffold-HUVEC و HepG2+Scaffold تیمار شده با غلظت ۱۰۰ ng/ml آواستین هیچ تفاوت معنی داری را در زنده مانده سلولها نشان نداد، این در حالی است که غلظتهای ۵۰۰ ng/ml و ۲۵۰ آواستین موجب کاهش معنی دار ($P<0.05$) زنده مانده سلولها در گروه HepG2+Scaffold-HUVEC شده است. براساس نتایج به دست آمده میزان IC_{50} برای گروه HepG2+Scaffold+Avastin مقدار ۲۱۲/۴۲ ng/ml و IC_{50} برای گروه HepG2+Scaffold-HUVEC+Avastin مقدار ۲۰۴/۹ ng/ml محاسبه شد.



نمودار ۱- بررسی زنده مانده سلولها در گروه های مختلف HepG2 با استفاده از تست MTT. حروف شبیه به هم نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار و حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P<0.05$) نسبت به یکدیگر می باشند.

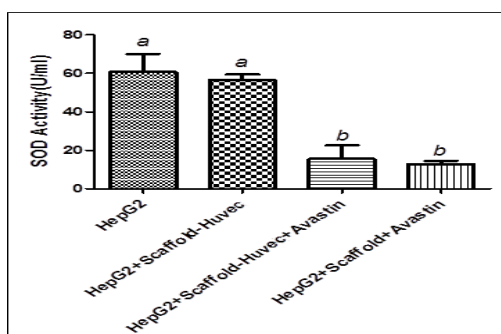
بررسی میزان آپوپتوز در سلولهای تیمار شده

نتایج بررسی آپوپتوز اولیه، آپوپتوز تأخیری و آپوپتوز کلی در گروه های مختلف تیمار شده در نگاره ۱ و نمودار ۲ نشان داده شده است. درصد سلولهای آپوپتوز شده در گروه

غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) نسبت به یکدیگر می باشند.

بررسی میزان فعالیت آنزیم SOD

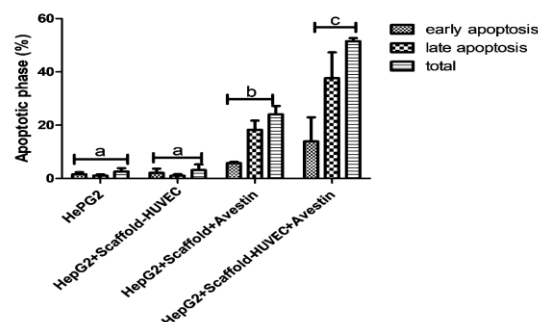
در نمودار ۴ میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه های مختلف سلول های HepG2، HepG2+Scaffold-، HepG2+Scaffold-HUVEC+Avastin، HUVEC و HepG2+Scaffold+Avastin نشان داده شده است. همان طور که در نگاره ۵ نشان داده شده است، تفاوت معنی داری در سطح فعالیت آنزیم SOD بین دو گروه HepG2- Scaffold-HUVEC و HepG2+Scaffold تیمار شده با داروی آواستین نسبت به یکدیگر وجود ندارد، درحالیکه کاهش معنی داری در سطح فعالیت آنزیم SOD در هر دو گروه سلول تیمار شده با آواستین نسبت به گروه هایی که تحت تیمار قرار نگرفته اند، مشاهده می شود ($P < 0.05$).



نمودار ۴- نتایج بررسی فعالیت آنزیم SOD در گروه های مختلف سلولی. حروف شبیه به هم نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار و حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) نسبت به یکدیگر می باشند.

بررسی میزان TOS

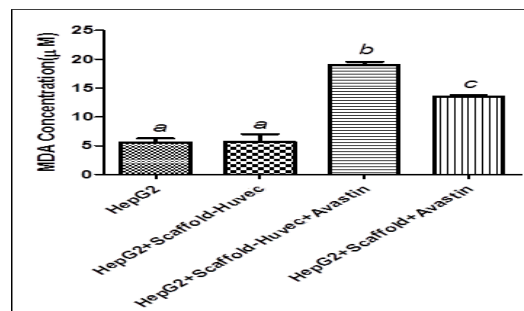
در نمودار ۵ میزان وضعیت اکسیدانی تام را در گروه های مختلف سلولی HepG2، HepG2+Scaffold-HUVEC، HepG2+Scaffold-HUVEC+Avastin و HepG2+Scaffold+Avastin نشان داده شده است. تفاوت معنی داری در سطح TOS بین دو گروه سلولی HepG2-



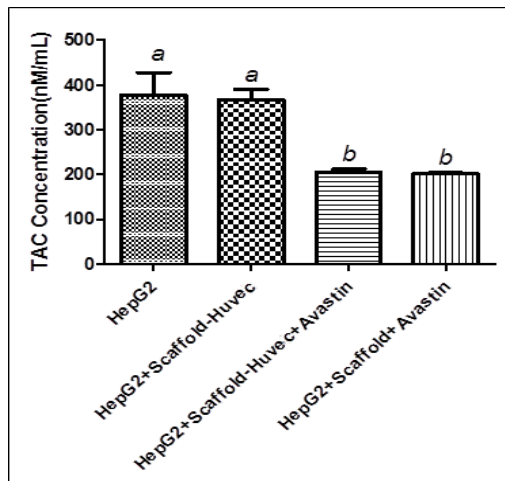
نمودار ۲- بررسی درصد آپوپتوز اولیه، آپوپتوز تاخیری و آپوپتوز کل در سلولها در گروه های مختلف HepG2 با استفاده از تست فلوسایتمتری. حروف شبیه به هم نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار و حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) نسبت به یکدیگر می باشند.

بررسی میزان MDA

نمودار ۳ نشان دهنده میزان MDA در گروه های مختلف سلول های HepG2، HepG2+Scaffold-HUVEC، HepG2+Scaffold-HUVEC+Avastin و HepG2+Scaffold+Avastin می باشد. مطابق با این نمودار تفاوت معنی داری بین دو گروه HepG2+Scaffold- HUVEC و HepG2+Scaffold تیمار شده با داروی آواستین مشاهده شد ($P < 0.05$). بین دو گروه سلولی HepG2 و HepG2+Scaffold-HUVEC تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) وجود ندارد.



نمودار ۳. نتایج بررسی میزان MDA در گروه های مختلف سلولی. حروف شبیه به هم نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار و حروف

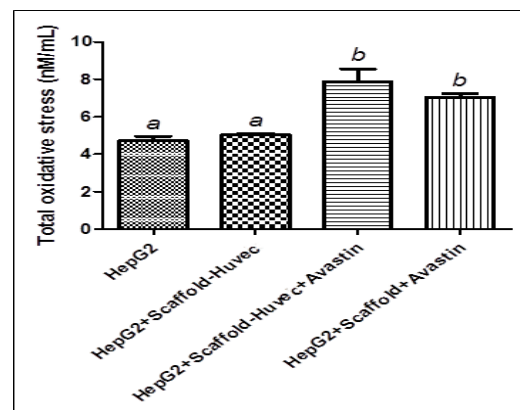


نمودار ۶. نتایج بررسی میزان TAC در گروه های مختلف سلولی. حروف شبیه به هم نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار و حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P<0.05$) گروه های مختلف نسبت به یکدیگر می باشند.

بررسی میزان پروتئین P53

میزان حضور پروتئین P53 با به روش ایمونوسیتوشیمی در گروه های مختلف سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. نگاره ۲ نشان دهنده میزان پروتئین P53 در گروه های مختلف سلول های HepG2، HepG2+Scaffold-HUVEC، HepG2+Scaffold-HUVEC+Avastin و HepG2+Scaffold+Avastin می باشد. همچنین نمودار ۷ بیانگر آن است که هیچ گونه تفاوت معناداری در بیان P53 بین دو گروه HepG2 و HepG2+Scaffold-HUVEC تیمار نشده مشاهده نشده است. این درحالی است که میزان بیان این پروتئین در هر دو گروه تیمار شده با دارو نسبت به گروه های تیمار نشده به طور معناداری بیشتر بود ($P<0.05$). با این وجود کاهش قابل ملاحظه ای در بیان این پروتئین در سلول های HepG2+Scaffold+Avastin نسبت به سلول های HepG2+Scaffold-HUVEC تیمار شده با دارو وجود داشت ($P<0.05$).

HepG2+Scaffold و Scaffold-HUVEC تیمار شده با داروی آواستین مشاهده نشد و این در حالی است که افزایش معنی داری ($P<0.05$) در سطح TOS در گروه های سلولی HepG2- و HepG2+Scaffold-HUVEC تیمار شده با آواستین، در مقایسه با گروه های سلولی HepG2 و HepG2+Scaffold-HUVEC تیمار نشده مشاهده شد ($P<0.05$).

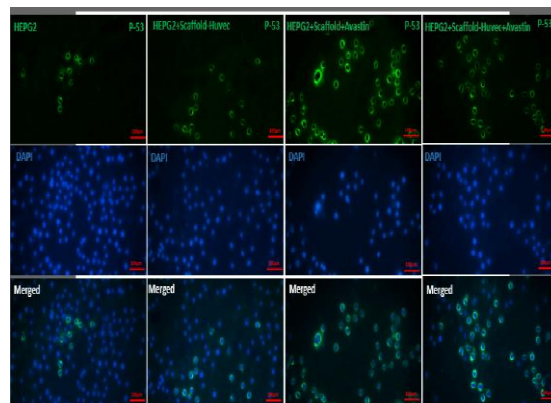


نمودار ۵: نتایج بررسی میزان TOS در گروه های مختلف سلولی. حروف شبیه به هم نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار و حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P<0.05$) نسبت به یکدیگر می باشند.

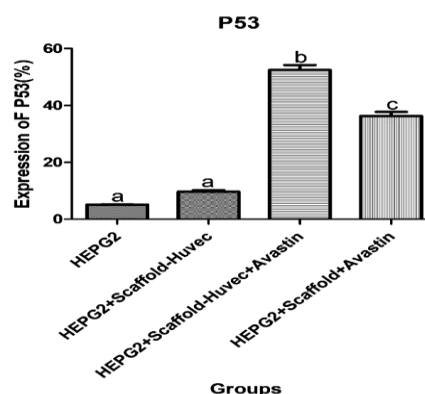
بررسی میزان TAC

نمودار ۶، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام را در گروه های مختلف سلولی HepG2، HepG2+Scaffold-HUVEC، HepG2+Scaffold-HUVEC+Avastin و HepG2+Scaffold+Avastin نشان می دهد. همان طور که در نمودار ۶ نشان داده شده است اختلاف معنی داری ($P<0.05$) بین دو گروه HepG2+Scaffold-HUVEC و HepG2+Scaffold تیمار شده با داروی آواستین مشاهده نشد درحالی که میزان TAC در گروه های HepG2- Scaffold-HUVEC و HepG2+Scaffold تیمار شده با آواستین در مقایسه با گروه های تیمار نشده HepG2 و HepG2+Scaffold-HUVEC تفاوت معنی داری دیده شد ($P<0.05$).

در نتیجه خون رسانی به بافت های تومور را محدود می کند (۲۹، ۳۰). یکی از فاکتورهایی که می تواند محققین را به سمت شناخت بهتر مکانیسم عمل دارو کمک نماید، شبیه سازی کنام سلولهای سرطانی در شرایط In vitro می باشد. در این پژوهش برای شبیه سازی کنام سلولهای HepG2 از کشت سلولهای HUVEC در داربست هیدروژلی استفاده شد. سلولهای HUVEC با توانایی ترشح انواع فاکتورهای VEGF و ترومبوسپوندین-۱ در ایجاد کنام مناسب برای تکثیر سلولهای سرطانی از جمله HepG2 موثر می باشد (۳۱). بنابراین زمانی که سلولهای HepG2 با داربست هیدروژلی و huvec به همراه داروی آواستین همکشتی و تیمار می شوند، آواستین علاوه بر افزایش معنی دار آپوپتوز بر سلولهای hep2 به نظر می رسد می تواند بر ترشح فاکتورهای رگزایی سلولهای huvec نیز تاثیر گذارد. نتایج mtt و آپوپتوز این مطالعه، نشان داد که غلظت های مختلف آواستین می تواند باعث کاهش معنی دار در زنده مانی سلول های همکشتی داده شده شود و این اتفاق در رفتاری وابسته به غلظت اتفاق می افتد بطوریکه بیشترین تاثیر دارو در غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر می باشد. همکشتی سلول های سرطانی با huvec و همچنین همکشتی با scaffold+huvec باعث افزایش معنی دار القای اثر ضدسرطانی آواستین شد با این تفاوت که تاثیرگذاری آن بر روی سلول های هم کشتی شده با scaffold+huvec بیشتر بود. بررسی درصد وقوع آپوپتوز در سلول های همکشتی شده با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری نشان داد که سلول سرطانی همکشتی شده با scaffold+huvec که با داروی آواستین تیمار شدند، بیشترین وقوع آپوپتوز اولیه و تأخیری را نسبت به سایر گروه ها نشان داد. این مطالعه، تأثیر بالقوه همکشتی سلول سرطانی را با داربست هیدروژلی و huvec برای القای آپوپتوز از طریق داروی آواستین نشان می دهد.



نگاره ۲-رنگ آمیزی DAPI برای بررسی میزان پروتئین P53 در گروه های مختلف سلولی.



نمودار ۷. درصد میزان پروتئین P53 در گروه های مختلف سلولی. حروف شبیه به هم نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار و حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) گروه های مختلف نسبت به یکدیگر می باشند.

بحث

امروزه استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال یکی از گزینه های درمانی بسیار مورد توجه پژوهشگران می باشد. آواستین نوعی از آنتی بادی مونوکلونال IgG1 انسانی نو ترکیب است که ناحیه متغیر زنجیره سبک آن موجب عدم اتصال VEGF به گیرنده VEGF می شود (۲۸). آواستین با اتصال انتخابی VEGF عمل می کند و در نتیجه، اتصال VEGF به گیرنده های سطح سلولی آن را مهار می کند. این مهار منجر به کاهش رشد عروق خونی تومور می شود و

در راستای مطالعه حاضر، در مطالعه truelsens نیز نشان داده شد پس از تیمار سلول سرطانی با huvec و چند عامل ضد رگزایی، میزان آنژیوژنز و بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی به شدت کاهش می یابد که در نهایت موجب آپوپتوز در سلول سرطانی می شود (۳۲). در مطالعه Dai و همکاران نیز نشان داده شد که تیمار سلول های سرطانی پروستات با cabozantinib (آنتی بادی مونوکلونال) موجب کاهش تهاجم در سرطان و همچنین مسدودسازی فسفوریلاسیون گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی می شود که در نهایت به کاهش زنده مانی سلول های سرطانی می انجامد (۳۳)، که همچون نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد آنتی بادی های مونوکلونال با مکانیسم های متفاوت موجب کاهش زنده مانی سلول های سرطانی می شوند. به نظر می رسد که داربست ها دارای راندمان بالایی در رهاسازی کنترل شده دارو می باشند. در پژوهشی که توسط Chittasupho و همکارانش صورت گرفت نشان داده شد که زنده ماندن و تکثیر سلول های A549 تیمار شده با دوکسوروبیسین در داربست های ژلاتینی به طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت (۳۴). به نظر می رسد که تزریق نسل جدید داروهای ضد سرطانی که همراه با هیدروژل می باشند به تومور یا مجاور آن می تواند تاثیر بسیار بهتری در عملکرد دارو داشته باشد (۳۵). در مطالعه دیگر نشان داده شد بارگزاری داروی ضد سرطانی داکسی سلیمین در ساختار هیدروژلی می تواند بر تومور موضعی در مخاط سرطان ریه اثر آپوپتوتیک بالقوه داشته باشد (۳۶). این مطالعات در راستای مطالعه کنونی نشان می دهند بارگزاری عوامل ضد سرطانی در ساختار هیدروژلی می تواند روشی جدید برای مقابله با توسعه سلول های سرطانی باشد.

استرس اکسیداتیو ارتباط نزدیکی با سرطان زایی در قالب گونه های اکسیژن فعال (ROS) دارد. در فرآیندهای

فیزیولوژیکی و پاتولوژیک مختلفی که شامل آسیب DNA، تکثیر، چسبندگی سلولی، بقا و آپوپتوز می شود، دخالت دارد. تعاملات پیچیده ای بین تولید ROS، سیگنال دهی ROS، آسیب ناشی از ROS و سرطان زایی وجود دارد. ROS در بروز و پیشرفت تومور با آسیب غیرقابل برگشت DNA، تعدیل مسیرهای سیگنالینگ و مختل کردن مکانیسم فیزیولوژیکی آپوپتوز، مشارکت کنندگان اصلی در پیشرفت روند تکثیر سلولهای سرطانی می باشند (۳۷). مطالعات بیوشیمیایی نشان داد، میزان فعالیت آنزیم SOD در هر دو گروه سلولی تیمار شده کاهش معنادار تقریباً سه برابری نسبت به گروه کنترل دارد. از طرفی سطح TOS با افزایش قابل ملاحظه در هر دو گروه HepG2+Scaffold-HUVEC و HepG2+HUVEC تیمار شده با داروی آواستین همراه بود ولی سطح TAC دچار کاهش معنادار در هر دو گروه یاد شده نسبت به گروه کنترل شد. آنزیم SOD یک آنزیم حیاتی برای از بین بردن رادیکال های سوپراکسید می باشد و به عنوان یک آنتی اکسیدان کلیدی در سلول های هواری در نظر گرفته می شود. مصرف اکسیژن برای فسفوریلاسیون اکسیداتیو در طول تولید ATP در میتوکندری ضروری است، در حین فرآیند متابولیسم سلولی گونه های فعال اکسیژن (ROS)، از جمله رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن تولید می شوند. تجمع ROS منجر به استرس اکسیداتیو سلولی می شود و اگر میزان آن کم نشود، می تواند سبب آسیب مولکول های زیستی مهم مانند لیپیدهای غشایی، پروتئین ها و DNA شود. از آنجایی که SOD آنزیم کلیدی در اولین مرحله متابولیسمی حذف سوپراکسید است، کمبود SOD یا مهار فعالیت آنزیم ممکن است باعث تجمع شدید سوپراکسید در سلول ها شود و منجر به مرگ سلولی شود. بنابراین، مهار SOD ممکن است راه جدیدی برای کشتن سلول های سرطانی فراهم کند (۳۸).

نتایج آزمون بیوشیمیایی، افزایش میزان MDA را در هر دو گروه همکشتی شده با HUVEC و Scaffold-HUVEC و تیمار شده با دارو آواستین را نشان داد که این افزایش در گروه تیمار شده با Scaffold-HUVEC بطور معناداری بیشتر از دیگر گروه ها بود. یکی دیگر از نشانگرهای استرس اکسیداتیو، افزایش MDA است که نشان دهنده پراکسیداسیون لیپیدی ساختار غشا و آسیب سلولی به دلیل کاهش آنزیم های آنتی اکسیدانی درون زاست (۳۹). زمانیکه فعالیت SOD کاهش می یابد، منجر به افزایش ROS در سلول ها می شود که در نهایت افزایش ROS منجر به افزایش MDA، افزایش فاکتورهای اکسیدانی و کاهش آنتی اکسیدان ها می شود (۴۰). لذا مطابق با نتایج حاضر پس از تیمار سلول های سرطانی با Scaffold-HUVEC شاهد افزایش استرس اکسیداتیو در سلول های سرطانی HepG2، افزایش سطح MDA، کاهش سطح SOD، افزایش سطح اکسیدان ها و کاهش آنتی اکسیدان ها در سلول های سرطانی بودیم. در مطالعه ای که توسط Sroda و همکارانش بر روی سلولهای سرطانی کولون Lo Vo انجام شد، نشان داده شد که مشتقات فنوتیازین می تواند با تاثیر گذاشتن بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش ROS سبب افزایش معنادار میزان آپوپتوز در سلولهای تیمار شده شوند (۴۰).

در این مطالعه نتایج ICC نشان داد که داروی آواستین می تواند باعث افزایش درصد بیان P53 در سلول های HepG2 همکشتی شده با HUVEC و Scaffold-HUVEC تحت تیمار با آواستین شود که این افزایش در سلول های همکشتی شده با داربست به طور معناداری بیشتر از گروه همکشتی شده با HUVEC به تنهایی بود که نشان می دهد احتمالاً بروز آپوپتوز می تواند به دلیل افزایش بیان P53 و از طریق مسیر P53 باشد. مسیر آپوپتوز با واسطه P53 یکی از مسیرهای اصلی سیگنال دهی آپوپتوز است که شامل

تحریک هر دو مسیر بیرونی و درونی آپوپتوز توسط پروتئین P53 است. پروتئین P53 یک فاکتور رونویسی هسته ای است که بیان طیف گسترده ای از ژن های دخیل در آپوپتوز، توقف رشد یا پیری را در پاسخ به استرس ژنوتوکسیک یا سلولی تنظیم می کند (۴۱). بالا رفتن سطح پروتئین P53 با افزایش آپوپتوز در سلول ها همراه است (۴۲). آواستین با افزایش بیان P53 در شرایط همکشتی شده موجب القای آپوپتوز در سلول های HepG2 شده است. مطالعه ایمونوهیستوشیمی در تحقیقی که توسط Thiel صورت گرفت نشان داد، بیمارانی که با بواسیزوماب درمان شده بوده اند سطح پروتئین P53 بالایی دادند (۴۳). در بیماران مبتلا به سرطان گلیوبلاستوما پس از درمان با بواسیزوماب، پلی مورفیسم های مختلفی از پروتئین P53 با استفاده از تکنیک RFLP شناسایی شدند (۴۴).

پروتئین سرکوبگر تومور P53، سلول های غیرطبیعی را با القای توقف رشد یا با تحریک آپوپتوز محدود می کند. علاوه بر این، P53 از ژنوم در برابر اکسیداسیون توسط گونه های اکسیژن فعال (ROS) محافظت می کند، که یکی از دلایل اصلی آسیب DNA و بی ثباتی ژنتیکی است. در غیاب تنش های شدید، سطوح نسبتاً پایین p53 برای تنظیم مجدد چندین ژن آنتی اکسیدان کافی است که با کاهش ROS داخل سلولی همراه است. کاهش p53 منجر به اکسیداسیون بیش از حد DNA، افزایش نرخ جهش و بی ثباتی کاریوتیپ می شود (۴۵). در مطالعه ما نشان داده شد که فعالیت آنتی اکسیدانی در سلول های HepG2 افزایش پیدا کرده است. به نظر می آید P53 توانسته است با افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در سلول های HepG2 و سلول های HUVEC سبب افزایش معنی دار آپوپتوز در سلول های HepG2 شود. در سلول های HepG2 فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی SOD کاهش پیدا کرده است و همین موضوع سبب افزایش MDA در سلول های HepG2 شده است که این امر خود

3. Bahman AA, Abaza MSI, Khoushiash SI, Al-Attiyah RJ. Sequence-dependent effect of sorafenib in combination with natural phenolic compounds on hepatic cancer cells and the possible mechanism of action. *International journal of molecular medicine*. 2018;42(3):1695-715.
4. Ellis LM. Epidermal growth factor receptor in tumor angiogenesis. *Hematology/Oncology Clinics*. 2004;18(5):1007-21.
5. Geindreau M, Bruchard M, Vegran F. Role of cytokines and chemokines in angiogenesis in a tumor context. *Cancers*. 2022;14(10):2446.
6. Peng S, Wang Y, Peng H, Chen D, Shen S, Peng B, et al. Autocrine vascular endothelial growth factor signaling promotes cell proliferation and modulates sorafenib treatment efficacy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2014;60(4):1264-77.
7. Zhang Y, Brekken RA. Direct and indirect regulation of the tumor immune microenvironment by VEGF. *Journal of Leukocyte Biology*. 2022;111(6):1269-86.
8. Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argáez V, Lara-Riegos J, et al. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer. *Frontiers in oncology*. 2019;9:1370.
9. Gatenbee CD, Minor ES, Slebos RJ, Chung CH, Anderson AR. Histoecology: Applying ecological principles and approaches to describe and predict tumor ecosystem dynamics across space and time. *Cancer Control*. 2020;27(3):1-7
10. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18:1-19.
11. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde

بیانگر آن است که سلول‌های سرطانی به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی آواستین به سمت آپوپتوز و نابودی پیش می‌روند.

نتیجه گیری

یافته های این پژوهش نشان داد که احتمالاً آواستین می تواند داروی قابل اعتمادی جهت مقابله با سرطان کبد باشد. با استفاده از روش MTT، کاهش معنی دار زنده مانى سلول های HepG2 در کشت سه بعدی هیدروژل شبیه سازی شده تحت تیمار با آواستین نشان داده شد. به نظر می رسد اثرات ضدسرطانی آواستین بطور فزاینده ای تحت تاثیر نحوه کشت سلولهای HepG2 می باشد. کشت سلولها در ساختار داربستی هیدروژلی سبب افزایش معنی دار MDA و ظرفیت اکسیدان کل و کاهش فعالیت معنی دار آنزیم SOD و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پس از تیمار با آواستین در مقایسه با کشت دوبعدی سلولها شد. همچنین یافته های مطالعه حاضر نشان داد که تیمار سلولهای HepG2 کشت داده شده در داربست هیدروژلی با آواستین می تواند سبب افزایش معنی بیان پروتئین های P53 در مقایسه با کشت دوبعدی سلولها شود. افزایش بیان P53 می تواند در القای مسیر آپوپتوزی موثر باشد.

فهرست منابع

1. Igunwobi OO, Harricharran T, Huaman J, Galuza A, Odumuwaogun O, Tan Y, et al. Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World journal of gastroenterology*. 2019;25(19):2279.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.

- and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014.
12. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(6):1583-606.
13. Lymperaki E, Makedou K, Iliadis S, Vagdatli E. Effects of acute cigarette smoking on total blood count and markers of oxidative stress in active and passive smokers. *Hippokratia*. 2015;19(4):293.
14. Altun I, Sonkaya A. The most common side effects experienced by patients were receiving first cycle of chemotherapy. *Iranian journal of public health*. 2018;47(8):1218-9.
15. Chu E, Sartorelli A. Cancer chemotherapy. *Lange's Basic and Clinical Pharmacology*. 2018:948-76.
16. Bicknell R. Targeting angiogenesis with monoclonal antibodies. *Annals of Oncology*. 2006;17:x76-x8.
17. Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clinical therapeutics*. 2006;28(11):1779-802.
18. Zhang P-p, Dong Q, Hua Y-b, XU H-F. Effects of bevacizumab on morphology and apoptosis of human retinal pigment epithelial cells as well as the expression of apoptosis-related factors. *Recent Advances in Ophthalmology*. 2018:314-8.
19. Le TBU, Vu TC, Ho RZW, Prawira A, Wang L, Goh BC, et al. Bevacizumab augments the antitumor efficacy of infigratinib in hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(24):9405.
20. Shrivastava P, Vishwakarma N, Gautam L, Vyas SP. Magnetically responsive polymeric gels and elastomeric system (s) for drug delivery. *Smart Polymeric Nano-Constructs in Drug Delivery*: Elsevier; 2023. p. 129-50.
21. Liu W, Ou-Yang W, Zhang C, Wang Q, Pan X, Huang P, et al. Synthetic polymeric antibacterial hydrogel for methicillin-resistant staphylococcus aureus-infected wound healing: nanoantimicrobial self-assembly, drug-and cytokine-free strategy. *ACS nano*. 2020;14(10):12905-17.
22. Yao X, Zhu G, Zhu P, Ma J, Chen W, Liu Z, et al. Omniphobic ZIF-8@ Hydrogel membrane by microfluidic-emulsion-templating method for wound healing. *Advanced Functional Materials*. 2020;30(13):1909389.
23. Kass LE, Nguyen J. Nanocarrier-hydrogel composite delivery systems for precision drug release. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2022;14(2):e1756.
24. Li X, Xu X, Xu M, Geng Z, Ji P, Liu Y. Hydrogel systems for targeted cancer therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11.
25. Lee JH, Tachibana T, Yamana K, Kawasaki R, Yabuki A. Simple formation of cancer drug-containing self-assembled hydrogels with temperature and pH-responsive release. *Langmuir*. 2021;37(38):11269-75.
26. Grosskopf AK, Labanieh L, Klysz DD, Roth GA, Xu P, Adebowale O, et al. Delivery of CAR-T cells in a transient injectable stimulatory hydrogel niche improves treatment of solid tumors. *Science Advances*. 2022;8(14):eabn8264.
27. Buitrago JO, Patel KD, El-Fiqi A, Lee J-H, Kundu B, Lee H-H, et al. Silk fibroin/collagen protein hybrid cell-encapsulating hydrogels with tunable gelation and improved physical and biological properties. *Acta Biomaterialia*. 2018;69:218-33.
28. Zhang Z, Neiva KG, Lingen MW, Ellis LM, Nör JE. VEGF-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of VEGFR1 and VEGFR2. *Cell Death & Differentiation*. 2010;17(3):499-512.
29. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in

- metastatic colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(19):1308-24.
30. Lv W, Zhao Y, Li X, Zhang M. Clinical effects of bevacizumab targeted treatment on advanced colorectal cancer with liver metastasis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(11):2249-55.
31. Sarkanen J-R, Mannerström M, Vuorenperä H, Uotila J, Ylikomi T, Heinonen T. Intra-laboratory pre-validation of a human cell based in vitro angiogenesis assay for testing angiogenesis modulators. *Frontiers in pharmacology*. 2011;1(147):1-13.
32. Truelsen SLB, Mousavi N, Wei H, Harvey L, Stausholm R, Spillum E, et al. The cancer angiogenesis co-culture assay: In vitro quantification of the angiogenic potential of tumoroids. *Plos one*. 2021;16(7):e0253258.
33. Dai J, Zhang H, Karatsinides A, Keller JM, Kozloff KM, Aftab DT, et al. Cabozantinib Inhibits Prostate Cancer Growth and Prevents Tumor-Induced Bone Lesions Cabozantinib Inhibits Prostate Cancer Growth in Bone. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(3):617-30.
34. Chittasupho C, Angklomklew J, Thongnopkoon T, Senavongse W, Jantrawut P, Ruksiriwanich W. Biopolymer hydrogel scaffolds containing doxorubicin as a localized drug delivery system for inhibiting lung cancer cell proliferation. *Polymers*. 2021;13(20):3580.
35. Bu Y, Shen H, Yang F, Yang Y, Wang X, Wu D. Construction of tough, in situ forming double-network hydrogels with good biocompatibility. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017;9(3):2205-12.
36. Guo D, Xu S, Huang Y, Jiang H, Yasen W, Wang N, et al. Platinum (IV) complex-based two-in-one polyprodrug for a combinatorial chemo-photodynamic therapy. *Biomaterials*. 2018;177:67-77.
37. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-74.
38. Hileman EA, Achanta G, Huang P. Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2001;5(6):697-710.
39. Escudero NL, De Arellano M, Fernández S, Albarracín G, Mucciarelli S. Taraxacum officinale as a food source. *Plant foods for human nutrition*. 2003;58:1-10.
40. Środa-Pomianek K, Michalak K, Świątek P, Poła A, Palko-Łabuz A, Wesołowska O. Increased lipid peroxidation, apoptosis and selective cytotoxicity in colon cancer cell line LoVo and its doxorubicin-resistant subline LoVo/Dx in the presence of newly synthesized phenothiazine derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;106:624-36.
41. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine*. 2010;9(45):145-52.
42. Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer and Metastasis reviews*. 1995;14:3-15.
43. Thiel KW, Devor EJ, Filiaci VL, Mutch D, Moxley K, Alvarez Secord A, et al. TP53 sequencing and p53 immunohistochemistry predict outcomes when bevacizumab is added to frontline chemotherapy in endometrial cancer: An NRG oncology/gynecologic oncology group study. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(28):3289-300.
44. Shen C-C, Cheng W-Y, Lee C-H, Dai X-J, Chiao M-T, Liang Y-J, et al. Both p53 codon 72 Arg/Arg and pro/Arg genotypes in glioblastoma multiforme are associated with a better prognosis in bevacizumab treatment. *BMC cancer*. 2020;20(1):1-13.
45. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature medicine*. 2005;11(12):1306-13.

